第 37 卷 第 2 期 1994 年 5 月
昆 虫 学 报 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
Vol. 37, No. 2 May, 1994

棉铃虫对氰戊菊酯抗性和敏感品系的选育*

吴益东 沈晋良 尤子平
(南京农业大学植保系,南京 210014)

摘要 用氰戊菊酯对来自阳谷的棉铃虫 (YG) *Heliothis armigera* (Hübner) 进行抗性品系的筛选。在 15 代期间经过 9 代的室内选育,获得抗性品系 (Fen-R),抗性倍数高达 2463 倍,筛选后 F_{15} 代 LD_{50} 值 (24.1412μg/头) 比筛选前 F_1 代 LD_{50} 值 (0.2020μg/头) 提高了 119.5 倍。对来自偃师的棉铃虫 (YS) 进行了连续两代单对筛选,得到敏感品系 (Fen-S),敏感品系的 LD_{50} 值为 0.0116μg/头,接近 1983 年东台敏感品系的 LD_{50} 值 (0.0098μg/头)。Fen-R 抗性品系筛选前后分别测定了七种杀虫剂的剂量-死亡回归线,发现 Fen-R 抗性品系对溴氰菊酯 [LD_{50}(Fen-R)/LD_{50}(YG) = 5.2X] 和氯氰菊酯 (2.5X) 具有一定程度的交互抗性;而对功夫菊酯 (0.66X),氯菊酯 (0.87X)、灭多威 (0.74X) 及久效磷 (1.5X) 没有交互抗性。氰戊菊酯加 Pb 的增效试验结果表明棉铃虫对氰戊菊酯的抗性主要是由于多功能氧化酶的代谢作用。毒理学资料还暗示抗性为多因子(基因)的。

关键词 棉铃虫 抗性品系的筛选 氰戊菊酯 交互抗性 多功能氧化酶

自八十年代初以来,我国棉区广泛地使用氰戊菊酯、溴氰菊酯等拟除虫菊酯类农药。目前,华北棉区及其它地区的棉铃虫 *Heliothis armigera*(Hübner)已对拟除虫菊酯类农药不同程度的抗药性(沈晋良等,1991)。在澳大利亚、泰国、印度和印度尼西亚,棉铃虫对拟除虫菊酯类农药的抗药性都得到证实 (Gunning 等,1984; Ahmad 和 McCaffery, 1988; McCaffery 等,1989、1991)。研究棉铃虫对拟除虫菊酯类农药的抗性遗传基础、抗性机理、交互抗性范围、抗性生态遗传学及所用杀虫剂的选择压力,是了解抗性发展规律和确定抗性治理方案的基础。而深入开展上述研究的首要条件是必须培育出抗性品系和敏感品系。作者参照 Whitten (1978)、Jensen 等 (1984) 和 Noppum 等 (1986)的方法,用氰戊菊酯对采自田间的两个棉铃虫种群分别进行抗性品系和敏感品系的筛选。测定了抗性品系对常用药剂的交互抗性谱,并对抗性机理进行了初步研究。

材 料 和 方 法

一、供试昆虫

1. 阳谷棉铃虫 (YG): 1990 年采集对氰戊菊酯具有较高抗性水平的山东阳谷县的棉铃虫,作为抗性品系筛选的原始材料。

2. 偃师棉铃虫 (YS): 1991 年采集对氰戊菊酯具有较低抗性水平的河南偃师县的棉铃虫,作为敏感品系筛选的原始材料。

本文于 1992 年 5 月收到。
* 国家自然科学基金和"八五"攻关课题资助项目。

棉铃虫的室内饲养参照谭福杰(1987)的方法。饲养条件：温度27℃±1，相对湿度60—85%，光周期14:10(L:D)。毒力测定及品系筛选的试虫均为体重8.9±1.5mg的三龄幼虫。

二、供试药剂和生化试剂

氰戊菊酯	98%	江苏省激素研究所
溴氰菊酯	98%	法国 Roussel Uclaf 公司
功夫菊酯	97.2%	英国 ICI 公司
氯氰菊酯	98.38%	天津农药厂
氯菊酯	86.3%	江苏省农药研究所
久效磷	94%	南通农药厂
灭多威	98%	美国杜邦公司
增效醚（Pb）	技术级	英国 Koch-light 实验有限公司
磷酸三苯酯（TPP）	化学纯	上海化学试剂一厂

α-醋酸萘酯、α-萘酚、毒扁豆碱、固兰B盐等生化试剂均为分析纯或化学纯。

三、毒力测定方法

每种药剂均用丙酮稀释5—8个浓度，用毛细管点滴器（岛津CS-920高速薄层色谱扫描仪标定，体积为0.04—0.06μl）将药液点在试虫的胸部背板上。每个浓度处理20—30头，重复3次，以丙酮处理为对照。处理后48小时检查死亡率，以轻触虫体不能产生明显反应者为死亡。按机率值分析法计算毒力回归式和致死中量（LD_{50}）。用增效醚（Pb）或磷酸三苯酯（TPP）时，在杀虫剂处理前1小时按4μg/头点滴于试虫胸部背板。48小时后检查死亡率，求增效比(SR)。以1983年江苏东台县的棉铃虫对氰戊菊酯的毒力回归线作为相对敏感毒力基线(谭建国，1987；沈晋良等，1991)。相对敏感毒力基线的 LD_{50} 值为0.0098μg/头，LD_{99} 值为0.08μg/头，以 LD_{99} 值作为区分剂量。

四、品系的筛选方法

1. 抗性品系（Fen-R）的筛选采用群体筛选和单对筛选相结合的方法。群体筛选即用氰戊菊酯处理群体饲养的三龄幼虫，使死亡率维持在50%左右，处理后存活的个体作为下一代筛选的种虫。单对筛选即将20—30对棉铃虫雌雄蛾单对交配，将交配成功的单对后代隔离成一系列单对株系。再从每个单对株系中抽出30—50头标准测试幼虫，用一个适当的剂量处理，根据测定结果选出死亡率最低的二到三个株系，将其未测定的部分混合留种，供下一代筛选用。

2. 敏感品系（Fen-S）的筛选采用单对筛选的方法。将20—30对棉铃虫雌雄蛾单对交配，将成功交配的单对后代隔离成一系列单对株系。再从每个株系中抽出30—50头标准测试幼虫用区分剂量0.08μg/头进行测定，选出死亡率最高的二到三个株系，将其未测定部分混合留种，供下一代继续筛选。

五、酯酶活性测定

参照 Van Asperen（1962）介绍的方法，测定棉铃虫三龄幼虫酯酶对α-醋酸萘酯的水解活性。取5头三龄幼虫，用0.04mol/L磷酸缓冲液（pH7.0）在冰浴中进行匀浆。然后将匀浆液于4℃离心15分钟（4500rpm），取上清液并稀释若干倍。

在试管中先加入 3×10^{-4}mol/L 的 α-醋酸萘酯溶液（含 10^{-7}mol/L 毒扁豆碱）5ml，再加入 1ml 酶液，摇匀置于 25℃ 下，温育 25 分钟后立即加入 1ml 显色液（1% 固兰 B 盐和 5% 十二烷基硫酸钠溶液以 2:5(V/V) 混合而成）。待稳定半小时后，在分光光度计上测定 OD_{600} 值。从标准曲线上查出 α-萘酚生成量（m mol/L），计算酶活性（单位：m mol/L/分钟·头）。

结　　果

一、棉铃虫对氰戊菊酯抗性品系（Fen-R）的筛选

从表 1 可以看出，在筛选前 F_1 代棉铃虫具有 20.6 倍的抗性，b 值也较小（0.8203），表明棉铃虫个体之间对氰戊菊酯敏感性差异较大。在 F_2 代用 6 倍区分剂量杀死群体中敏感个体以及一部分杂合子个体，然后连续三代进行了单对筛选，至 F_5 代抗性已上升到较高水平，抗性倍数大于 191.8，与筛选前相比抗性提高了 9.3 倍以上。F_6 代由于成虫交配率低，雌蛾产卵量也少，未能筛选。在 F_7 代用同步饲养未筛选的阳谷的棉铃虫复壮已筛选过的棉铃虫混合株系。随后，F_8—F_{12} 代连续筛选，其中 F_{10} 代为单对筛选，当筛选到 F_{11}—F_{12} 代时，选择压力已高达区分剂量的 80 倍（6.4μg/头），抗性达 1006—1368 倍，

表 1　山东阳谷的棉铃虫对氰戊菊酯抗性品系的筛选

代别	选择压力 (μg/头)	48小时死亡率 (%)	毒力测定结果		RF**	抗性倍数***
			LD_{50}(μg/头)	b 值		
1	—	—	0.2020	0.8203	1.0	20.6
2	0.47	70.0	—	—	—	—
3*	0.24	11.1	—	—	—	—
4*	0.94	17.3	—	—	—	—
5*	1.88	25.4	>1.8800	—	>9.3	>191.8
6	—	—	—	—	—	—
7	—	—	—	—	—	—
8	0.80	33.9	—	—	—	—
9	1.60	48.6	2.6810	1.2044	13.3	276.6
10*	12.80	67.4	4.5813	1.1698	22.7	467.5
11	6.40	38.0	9.8557	1.5422	48.8	1005.7
12	6.40	30.0	13.4063	1.2581	66.4	1368.0
13	—	—	31.2525	1.1336	154.7	3189.0
14	—	—	—	—	—	—
15	—	—	24.1412	1.4340	119.5	2463.4

* 表示单对筛选的代别
** 经筛选后抗性提高的倍数 RF = F_x 代 LD_{50}/F_1 代 LD_{50}
*** 抗性倍数 = F_x 代的 LD_{50}/LD_{50}（东台，1983）

比筛选前提高 49—66 倍。到 F_{15} 代抗性高达 2463 倍，比筛选前提高了 119.5 倍。在室内饲养的 15 代中，用群体和单对两种筛选方法对阳谷的棉铃虫进行了 9 次筛选，培育出了一个对氰戊菊酯的高抗品系（Fen-R），该品系供进一步的抗性机理及交互抗性的研究。

二、棉铃虫对氰戊菊酯敏感品系（Fen-S）的筛选

从表 2 看出，经过 F_2 代的单对筛选，LD_{50} 值下降了一倍左右，b 值由 0.8335 提高到 2.6876。经 F_3 代的第二次单对筛选 LD_{50} 值又下降了一倍。F_4 代停止筛选，到 F_5 代 LD_{50} 值和 b 值都与 F_4 代相近，恢复到 1983 年东台的棉铃虫对氰戊菊酯的敏感性水平。通过连续两次单对筛选，培育出了一个对氰戊菊酯的相对敏感品系，供抗性机理、抗性遗传等研究用。

表 2 河南偃师的棉铃虫经连续两代单对筛选后对氰戊菊酯敏感性变化

代 别	LD_{50}(μg/头)	b 值	抗性倍数**
1	0.04416	0.8335	4.5
2*	——	——	——
3*	0.02024	2.6876	2.1
4	0.01044	2.5880	1.1
5	0.01116	2.6336	1.1

* 表示单对筛选的代别

** 抗性倍数 = F_x 代的 LD_{50}/LD_{50}（东台，1983）

三、Fen-R 品系的交互抗性谱

阳谷的棉铃虫（YG）经 15 代室内选育，得到 Fen-R 品系。分别测定筛选前阳谷的棉铃虫（YG）和选育成功的 Fen-R 品系对氰戊菊酯、溴氰菊酯、功夫菊酯、氯菊酯、久效磷和灭多威的敏感性。结果(见表 3)表明，筛选前后氰戊菊酯的 LD_{50} 值提高了 119.5 倍

表 3 氰戊菊酯筛选阳谷的棉铃虫对其它杀虫剂的敏感性变化

药 剂	LD_{50}(μg/头)		筛选前后相差倍数
	筛选前	筛选后	
氰戊菊酯	0.202000	24.141200	119.5
溴氰菊酯	0.003454	0.018030	5.2*
功夫菊酯	0.008233	0.005474	0.66
氯氰菊酯	0.021310	0.053280	2.5*
氯 菊 酯	0.027670	0.024180	0.87
久 效 磷	0.114800	0.172400	1.5
灭 多 威	0.113900	0.087420	0.74

* 经显著性检验，筛选前后 LD_{50} 值差异显著（$p<0.05$，t 测验）

的同时，溴氰菊酯和氯氰菊酯的 LD_{50} 值分别提高了 5.2 倍和 2.5 倍，经检验筛选前后 LD_{50} 值差异显著，说明 Fen-R 品系对溴氰菊酯和氯氰菊酯具有一定程度的交互抗性。而氰戊菊酯筛选前后，功夫菊酯、氯菊酯、久效磷和灭多威的 LD_{50} 值虽有一定波动，但差异不显著，这种波动一般可视为生测允许误差，不足以说明 Fen-R 品系对这些杀虫剂有交互抗性或负交互抗性。因此在棉铃虫抗性治理方案中，当氰戊菊酯因产生高抗而暂时停用后，继续使用溴氰菊酯和氯氰菊酯要特别慎重。相比而言使用功夫菊酯、灭多威和久效磷等作为取代品种较为理想。

四、Pb 和 TPP 的增效作用

从表 4 看出，Pb 对 Fen-R、Fen-S 品系的增效比分别为 143.0 和 1.0；TPP 对 Fen-R 品系的增效比为 1.0。试验结果表明，Pb 强烈抑制了 Fen-R 品系棉铃虫体内多功能氧化酶的代谢作用，增效作用极显著；而对 Fen-S 品系没有增效作用。TPP 对 Fen-R 品系没有增效作用。因此 Fen-R 品系的抗性主要是由于多功能氧化酶的代谢作用所致，与羧酸酯酶无关。但 Pb 对氰戊菊酯抗性的抑制作用约为 70—90%（加 Pb 后，仍有 17.2 倍的抗性），这表明棉铃虫对氰戊菊酯的抗性除了多功能氧化酶这一重要因子外还存在其它因子。另外，在 Fen-R 品系筛选过程中，b 值始终维持在 1—1.6 之间，即使 F_{10} 代的单对筛选也未能使 b 值有一个显著的提高，这也表明抗性可能是多因子的。

表 4　Pb 和 TPP 增效作用的测定

药剂	Fen-R 品系			Fen-S 品系		
	LD_{50} (μg/头)	抗性倍数	增效比 (SR)	LD_{50} (μg/头)	抗性倍数	增效比 (SR)
氰戊菊酯	24.1412	2463.4	——	0.01116	1.1	——
氰戊菊酯＋Pb	0.1688	17.2	143.0	0.01113	1.1	1.0
氰戊菊酯＋TPP	23.1027	2357.4	1.0	——	——	——

五、酯酶活性测定

测定 Fen-R 和 Fen-S 品系的三龄幼虫酯酶对 α-醋酸萘酯的水解活性，结果见表 5。这两个品系的酯酶活性几乎没有差异，表明 Fen-R 品系的抗性与酯酶无关。

表 5　Fen-R 品系和 Fen-S 品系酯酶活性比较

品系	酯酶活性 (m mol/L α-萘酚/头/分钟)	酶活指数 (R/S)
Fen-R	4.50×10^{-5}	1.01
Fen-S	4.45×10^{-5}	1.00

讨 论

国内外均有有关实夜蛾属（*Heliothis* spp.）室内抗性选择的报道。在室内抗性选择过程中，抗性发展的速度除了药剂本身的原因外，首先与供选择的原始材料抗性水平有关。原始材料的抗性水平低，抗性发展的速度就慢(谭建国，1987；Jensen 等，1984)；抗性水平高，抗性发展的速度就快。本研究采用对氰戊菊酯中等抗性水平的棉铃虫种群作为原始材料，仅选育5代，抗性就比选择前提高了9倍以上。其次与选择压力有关，棉铃虫室内抗性选择压力一般以药剂处理后死亡率（48小时）30%—60%为宜。选择压力太高，室内种群不易延续保存；选择压力太低，抗性发展的速度就会减慢。我们认为，棉铃虫对氰戊菊酯抗性品系的室内筛选结果可作为大田抗性预报的一个重要依据。在棉铃虫对氰戊菊酯中抗地区，如果不考虑敏感种群的稀释作用等因子，我们可以推算氰戊菊酯经3—4年的连续使用，大田种群的抗性就会达到几百至上千倍，这相当于该药剂几乎丧失了防治效果。因此在这些地区应及早限用，甚至暂停使用氰戊菊酯。

关于棉铃虫对拟除虫菊酯类农药的抗性机理，Forrester（1988a）总结为以下三个方面：(1)多功能氧化酶因子，(2)神经不敏感因子，(3)穿透因子。他还通过田间试验证实在田间多功能氧化酶是最重要的因子。作者的上述试验结果表明：棉铃虫对氰戊菊酯的抗性是多因子的，多功能氧化酶因子起主要作用。至于其它因子(可能包括神经不敏感因子和穿透因子)尚待作进一步研究。

昆虫对一种杀虫剂产生抗性以后，往往对其它没有使用过的药剂也会产生抗性，这种现象称为"交互抗性"。实际上，由于许多农药已经在大田防治中使用过，因此就不能简单地将田间抗性种群的抗性谱作为其交互抗性谱。已经在大田使用的农药品种之间是否存在交互抗性关系，应通过比较室内抗性品系筛选前后抗性谱的变化来确定。我们认为这是一种可行的方法。

DeVries 和 Georghiou（1980）发现用反式氯菊酯对家蝇 *Musca domestica* 进行筛选，获得了140倍的抗性。结果这个抗性品系对26种拟除虫菊酯产生了交互抗性。Priester 和 Georghiou(1980)报道，用顺式和反式氯菊酯分别对五带淡色库蚊 *Culex quinquefasciatus* Say 进行筛选，都获得了高水平的抗性。经测试后发现这两个抗性品系对30种拟除虫菊酯产生了交互抗性。一般认为，如果拟除虫菊酯的抗性机制主要是神经不敏感因子，那么就会对所有的拟除虫菊酯具有交互作用（Forrester，1988b)。作者通过对 Fen-R 品系的交互抗性谱测定，发现它对溴氰菊酯和氯氰菊酯产生了一定程度的交互抗性，这可能与 Fen-R 品系对氰戊菊酯的抗性机制，主要是多功能氧化酶的代谢作用有关，但对功夫菊酯和氯菊酯没有交互抗性，其原因有待于进一步研究。Leonard 等（1988）通过对一个抗氰戊菊酯的烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*（F.）品系交互抗性谱的研究，发现这个抗性品系对功夫菊酯的交互抗性程度很低，而对其它几种拟除虫菊酯如氯菊酯、氯氰菊酯、溴氰菊酯、顺式氰戊菊酯等具有较高程度的交互抗性(其中氯菊酯和氯氰菊酯已在田间广泛使用)。这与我们得到的结果基本一致。

根据棉铃虫对氰戊菊酯抗性机制和交互抗性的研究我们认为，在对氰戊菊酯已爆发严重抗性的棉区：(1)应立即暂时停用氰戊菊酯(包括含氰戊菊酯的复配剂)；鉴于氰戊菊

酯对溴氰菊酯和氯氰菊酯具有一定程度的交互抗性，上述两种药剂在这些棉区使用应特别慎重；功夫菊酯、久效磷、灭多威和微生物农药(如苏云金杆菌 (BT) 等)可作为替换品种，但也要合理轮换使用这些品种，避免单一依靠某一类杀虫剂。(2) 在田间使用拟除虫菊酯加增效醚 (Pb) 防治棉铃虫，但目前还存在一些问题尚待解决，如增效醚易光解从而影响防治效果，过度使用对增效醚也会产生抗性等。

参　考　文　献

沈晋良等 1991 我国棉铃虫对拟除虫菊酯类农药的抗性监测及预报。昆虫知识 28(6): 337—40。

谭福杰 1987 农业害虫抗药性测定方法。南京农业大学学报(4)增: 105—22。

谭建国 1987 棉铃虫对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性监测及抗性选择。南京农业大学学报(4)增: 36—43。

Ahmad, M. & A. R. McCaffery 1988 Resistance of insecticides in a Thailand strain of *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera:Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 81(1):45—8.

DeVries, D. H. & G. P. Georghiou 1980 A wide spectrum of resistance to pyrethroid insecticides in *Musca domestica*. *Experientia* 36:226—7.

Forrester, N. W 1988a Field selection for pyrethroid resistance genes. *The Australia Cotton Grower* 9(3):48—50.

Forrester, N. W. 1988b Possible new countermeasure for pyrethroid resistance. *The Australia Cotton Grower* 9(3):51—63.

Gunning, R. V., C. S. Easton, L. R. Greenup & V. E. Edge 1984 Pyrethroid resistance in *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera:Noctuidae) in Australia. *J. Econ. Entomol.* 77:1283—7.

Jensen, M. P., L. A. Crowder & T. F. Watson 1984 Selection for Permethrin resistance in the todacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 77:1409—11.

Leonard, B. R. et al. 1988 Insecticide cross-resistance in pyrethroid-resistant strains of tobacco budworm (L. Noctuidae) *J. Econ. Entomol.* 81(6):1529—35.

McCaffery, A. R., A. J. Walker & C. P. Topper 1991 Insecticide resistance in the bollworm, *Helicoverpa armigera* from Indonesia. *Pestic. Sci.* 32:85—90.

McCaffery, A. R., A. B. C. King, A. J. Walker & H. El-Nagir 1989 Resistance to synthetic pyrethroids in bollworm, *Heliothis armigera* from Andhra Pradesh, India. *Pestic. Sci.* 27:65—76.

Noppum, V., T Miyata & T. Saito 1986 Laboratory selection for resistance with phenthoate and fenvalerate in the diamond-back moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Crop Protection* 5(5):323—7.

Priester, T. M. & G. P. Georghiou 1980 Cross-resistance spectrum in pyrethroid-resistant *Culex pipiens fatigans*. *Pestic. Sci.* 11:617—24.

Van Asperen, K. 1962 A study of housefly esterase by means of a sensitive colorimetric method. *J. Ins. Physiol.* 8:401.

Whitten, C. J. 1978 Inheritance of methylparathion resistance in tobacco budworm larvae(Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 71:971—4.

LABORATORY SELECTION FOR FENVALERATE RESISTANT AND SUSCEPTIBLE STRAINS IN COTTON BOLLWORM, *HELIOTHIS ARMIGERA* (HÜBNER)

WU YI-DONG SHEN JIN-LIANG YOU ZI-PING
(Department of Plant Protection, Nanjing Agricultu: University, Nanjing 210014)

A fenvalerate resistant strain (Fen-R) of cotton bollworm, *Heliothis armigera* (Hübner), was obtained by laboratory selection of a strain (YG) collected from Yanggu County, Shandong Province in 1990 after nine selections with fenvalerate during fifteen generations, and exhibited about 2463-fold resistance to this insecticide as compared with a susceptible strain collected from Dongtai County, Jiangsu Province in 1983. The LD_{50} value (24.1412μg/larva) in F_{15} generation after selection increased to 119.5-fold as compared with the LD_{50} value (0.2020 μg/larva) of F_1. A fenvalerate susceptible strain (Fen-S) was developed by selection of progenies that resulted from single-pair matings of cotton bollworm collected from Yanshi County, Henan Province, under conditions free of insecticides, and its LD_{50} was 0.0116 μg/larva, close to that of Dongtai susceptible strain in 1983.

Dose-mortality regressions were estimated for seven insecticides applied to YG strain before selection treatments and to Fen-R strain, respectively. A spectrum of cross-resistance was detected to deltamethrin [LD_{50}(Fen-R)/LD_{50}(YG) = 5.2X] and cypermethrin (2.5×), but no cross-resistance to cyhalothrin (0.66×), permethrin (0.87×), methomyl (0.74×), and monocrotophos (1.5×). The studies on synergism of fenvalerate+Pb in Fen-R strain showed that resistance was due principally to the metabolic (multiple function oxidase) mechanism. Toxicological data suggested that more than one factors (genes) were responsible for resistance to fenvalerate in *Heliothis armigera* (Hübner).

Key words *Heliothis armigera* (Hübner)——selection for a resistant strain——fenvalerate——cross-resistance——multiple function oxidase